论著

文章编号:1000-5404(2009)19-1894-03

TLR4在实验性脑出血小鼠脑组织表达变化及其与神经功能缺损的相关性

钟 琪,杨清武,李俊祺,李敬诚,向 静,王景周 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所神经内科,重庆 400042)

摘 要:目的 探讨Toll样受体4(Toll-like receptor 4,TLR4)在脑出血小鼠血肿周围脑组织中的表达变化及其与神经功能缺损的相关性。**方法** 采用自体尾动脉血注入法复制脑出血小鼠模型,将30只雄性C57BL小鼠按照区组随机分组法分为假手术组、模型组,造模完毕后采取同样随机分组法根据不同时间点(术后6、24、48、72 h,5 d)分为5个亚组,每组3只。各组于不同时间点取材,采用荧光定量多聚酶链反应法(real-time PCR)检测小鼠脑组织TLR4 mRNA的表达,同时测定神经功能缺损评分,并分析二者间的相关性。**结果** 两组各时间点TLR4 mRNA均表达;与假手术组相比模型组TLR4 mRNA表达显著升高($P<0.05$),且在72 h达高峰。模型组相同时间点TLR4 mRNA的表达与假手术组比较均明显增高,差异有统计学意义($P<0.05$)。脑出血后神经功能缺损明显加重($P<0.05$),以48~72 h为著。相关分析显示,TLR4的表达与神经功能缺损呈直线相关($r^2=0.973$,$P<0.05$)。**结论** 结果提示TLR4可能在脑出血后脑损伤中具有重要作用。

关键词: 脑出血;炎症反应;TLR4

中图法分类号: R394-33;R394.3;R734.34 **文献标识码:** A

Upregulated expression of Toll-like receptor 4 in brain tissue surrounding hematoma correlates with neurologic deficits in experimental cerebral hemorrhage mice

ZHONG Qi, YANG Qing-wu, LI Jun-qi, LI Jing-cheng, XIANG Jing, WANG Jing-zhou (Department of Neurology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) in brain tissue surrounding hematoma of cerebral hemorrhage mice and the correlation between TLR4 and neurologic deficits. **Methods** The cerebral hemorrhage models of mice were made by injecting autologous arterial blood collected from caudal artery. Thirty male C57BL mice were randomly divided into 2 groups: sham-operation and model groups. Three mice of each group were killed for the brain tissue surrounding hematoma in 6, 24, 48, 72 h and 5 d after operation respectively. The expression of TLR4 mRNA in the tissue samples was determined by real-time PCR, and neurologic deficits were determined at the same time points. The correlation of the expression and the deficits was analyzed. **Results** The expression of TLR4 gene in model group was higher evidently than that in sham-operation group ($P<0.05$). Cerebral edema and neurologic deficits were significantly increased, especially at 48 to 72 h after operation. Correlation analysis showed that there was a linear correlation of the expression of TLR4 and neurologic deficits ($r^2=0.973$, $P<0.05$). **Conclusion** TLR4 plays an important role in brain lesions of the cerebral hemorrhage, and maybe the key point of inflammatory reactions after intracerebral hemorrhage.

Key words: intracerebral hemorrhage; inflammatory reactions; Toll-like receptor 4

脑出血(intracerebral hemorrhage,ICH)是指原发性非外伤性脑实质内出血,占全部脑卒中的20%~30%,死亡率和致残率高。目前发病机制仍不完全清楚,临床无特异有效的治疗方法,因此深入研究脑出血的发病机制有重要意义。已有研究表明:炎症反应在脑出血脑损伤中具有重要地位,是脑水肿及继发神经功能缺损加重的主要原因[1,2]。但目前仍不清楚产生

基金项目: 第三军医大学大坪医院野战外科研究所"1135"优秀人才工程专项基金(2006112)
Supported by "1135" Excellent Talent Engineering Foundation of Daping Hospital & Institute of Surgery(2006112)

作者简介: 钟 琪,女,湖北省武汉市人,硕士研究生,主治医师,主要从事急性脑血管病发病机制及防治方面的研究。电话:(023)68757842,E-mail:zhongqi_77@hotmail.com

通信作者: 杨清武,电话:(023)68757842,E-mail:Yangqwmlys@hotmail.com

收稿日期: 2009-09-02;**修回日期:** 2009-09-11

该炎症反应的上游关键环节,即血液本身及其代谢产物是通过什么关键分子发挥作用的。Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4 ,TLR4)是天然免疫系统识别病原微生物的主要受体。近期有研究发现血红素可通过单核巨噬细胞上 TLR4 诱发炎症反应,产生大量的炎症因子导致组织损伤[3],提示 TLR4 可能在脑出血后脑组织炎症反应中具有重要作用。因此,本研究采用自体尾动脉血注入法建立小鼠脑出血模型,观察 TLR4 的表达,为进一步研究 TLR4 在脑出血炎症损伤中的作用及机制奠定的基础。

1　材料与方法

1.1　主要材料和试剂

健康清洁级雄性 C57BL 小鼠 30 只,体质量(19.1 ±2.1)g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。脑立体定向仪(美国 Stoel Ting 公司);鼠及幼大鼠适配器(深圳瑞沃德公司);电子天平(上海精密科学仪器有限公司 YP1201N,精确度为 0. 1 mg);PCR System 9700 (Applied Biosy Stems 公司);无酶吸头、1.5 ml EP 管、200 μl PCR 管(Axygen Scientific 公司);低温高速离心机(Sigma 公司);所用引物由上海生物工程技术服务有限公司合成;Rever Tre Ace-a-逆转录试剂盒(Toyobo 公司);2 ×SYBR Green(Toyobo 公司)。

1.2　方法

1.2.1　模型制作　　参照按文献[4]的方法进行,将小鼠用水合氯醛按 40 mg/kg 腹腔注射麻醉,取尾动脉不抗凝血 25 μl,应用脑立体定向技术注入小鼠右侧尾壳核内,术毕用骨蜡封闭针孔,缝合头部皮肤。

1.2.2　动物分组　　按照区组随机分组法将小鼠分为模型组(15 只)、假手术组(15 只)。造模完毕后按不同时间点分为 5 个亚组,即术后 6、24、48、72 h 和 5 d,每组 3 只。

1.2.3　小鼠神经功能缺损评分　　参照 Longa(1989)标准进行,具体:0 级:无体征,记 0 分;Ⅰ级:动物不能完全伸直其前肢,记 1 分;Ⅱ级:动物一侧肢体瘫痪,有追尾现象,记 2 分;Ⅲ级:动物不能站立,打滚,记 3 分;Ⅳ级:无自发性活动,有意识障碍,记 4 分。

1.2.4　标本采集　　于相应时间点进行神经功能缺损评分,后断头处死动物,取血肿周围脑组织,称取 80 mg,置于液氮中,-80 ℃ 保存,用于抽提总 RNA。

1.2.5　TLR4 mRNA 的 Real-time PCR 定量检测

1.2.5.1　血肿周围脑组织总 RNA 抽提与纯化　　将 80 mg 组织加液氮研碎移入 1.5 ml EP 管中,加入 1 ml Trizol 冰上裂解 5 min,加入 1/5 体积氯仿(200 μl)漩涡振荡混匀,4 ℃,15 000 ×g,低温离心 5 min,取上层水相转移至另一 1.5 ml EP 管中,加等体积的异丙醇(约 400 μl),振荡混匀, 4 ℃,15 000 ×g,低温离心 20 min,弃上清,加冰预冷的 75% 乙醇 1 ml 轻轻混匀, 4 ℃, 15 000 ×g,低温离心 5 min,弃上清,加无水乙醇 1 ml,4 ℃, 15 000 ×g,低温离心 5 min,弃上清,空气干燥 5 ~ 10 min,加入 DEPC 水至 40 μl 溶解,-70 ℃保存待用。

1.2.5.2　逆转录反应　　在 PCR 管中建立如下反应体系(20 ml体系):依次加入如下试剂,5 ×RT buffer 5 μl,RNA Ace 0.5 μl, RNasin 0.5 μl,dNTPs 2.0 μl, Oligo(dT) 1.0 μl,补 1‰ DEPC 水至 20 μl。PCR 反应条件:(20 μl 体系置 PCR 仪内),42 ℃→10 min→30 ℃→20 min→ 99 ℃→5 min→4 ℃→5 min,立即冰浴,-20 ℃保存。引物由上海生工合成:TLR4:上游:5′-GTCAGTGTGATTGTGGTATCC-3′,下游:5′-ACCCAGTCCT-CATTCTGACTC-3′;对照 GAPDH:上游:5′-ACCCATCACCATCT-TCCAGGAG-3′,下游:5′-GAAGGGGCGGAGATGA TGAC-3′。

1.2.5.3　PCR 反应　　TLR4 的反应体系如下:cDNA 2.0 μl,TLR4-F 0.5 μl,TLR4-R 0.5 μl,2 ×SYBR Green 10.0 μl,H_2O 7.0 μl,总共 20 μl 混合在一个 0.2 ml PCR 管里,反应条件为预变性 94 ℃ 5 min 后,变性 94 ℃ 30 s,退火 60 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 45 s,45 个循环后 72 ℃延伸 10 min,PCR 产物为 149 bp。GAPDH 反应体系为:cDNA 2.0 μl,GAPDH-F 0.5 μl,GAPDH-R 0.5 μl,2 ×SYBR Green 10.0 μl,H_2O 7.0 μl,总共 20 μl 混合在一个 0.2 ml PCR 管里, PCR 反应条件:预变性 94 ℃ 2 min 后,变性 94 ℃ 30 s,退火 60 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 40 s;45 个循环后,最后延伸 72 ℃ 5 min。扩增产物为 160 bp。TLR4 的基因的量以 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 来表示,其值为以 TLR4 的表达量与 GAPDH 表达量的比值。

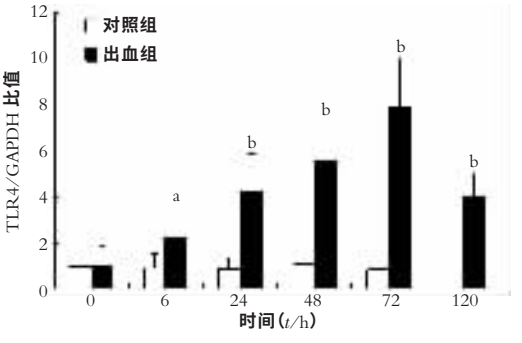
1.3　统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 进行单因素方差分析及相关性分析。

2　结果

2.1　TLR4 基因在脑出血模型小鼠血肿周围脑组织中的表达

各时间点 TLR4 mRNA 均表达。与假手术组组相比,各时相点脑出血组 TLR4 mRNA 相对表达显著升高,且在 72 h 达高峰。单因素方差分析显示差异均有统计学意义($P < 0.05$,$P < 0.01$)。结果见图 1。



a:$P < 0.05$,b:$P < 0.01$,与对照组比较

图 1　TLR4 在脑出血模型小鼠血肿周围脑组织中的表达

2.2 两组小鼠神经功能缺损评分变化

参照 Longa(1989)[5]标准,在相应的时间点进行评分,评分在1~3分者方能纳入模型组。结果显示假手术组各时相点评分均为0,模型组小鼠神经功能缺损评分明显高于假手术组,并在48~72 h最高[6 h(1.33±0.57)、24 h(1.67±0.67)、48 h(2.33±0.58)、72 h(2.67±0.44)、120 h(2.00±0.62)],差异呈高度显著性($P<0.01$)。

2.3 相关性检验分析

应用SPSS 13.0对TLR4表达相对倍数和模型组小鼠神经功能缺损评分两组数据进行相关性分析,结果提示2组数据之间呈直线正相关($r^2=0.973$,$P<0.05$)。

3 讨论

越来越多的研究表明,ICH发病最初并不是病情最严重的时期,一般在出血后2~5 d往往出现继发性神经损伤,引起神经功能缺损加剧,加重病情。因此,近年来有关脑出血继发性损伤发病机制和防治研究成为热点[6,7]。目前认为红细胞溶解产物诱发的炎症反应,血肿周围代谢异常等是导致神经损伤加重的主要原因,特别是炎症反应具有重要作用而备受关注[6],但机制至今尚不明了[2]。

TLR4作为重要的炎性受体,介导炎性损伤,其机制目前已基本明了[8],启动胞内信号转导,通过核因子-κB(NF-κB)和c-Jun氨基末端激酶(JNK)/应急激活蛋白激酶(SAPK)两条途径激活炎性细胞,导致炎性因子TNF-α、IL-6等的大量表达,触发一系列炎性反应。随后新的证据表明,TLR4还在动脉粥样硬化形成、脑缺血再灌注的炎症损伤中具有重要作用[9]。Figueiredo[3]研究发现在某些出血性疾病中,红细胞溶解产物血红素通过巨噬细胞上的TLR4产生大量炎症因子,引起炎症损伤,是出血性疾病引起组织损伤的重要机制。目前证实,在中枢神经系统,TLR4主要在神经元和小胶质细胞表达,而在血管内皮细胞、星形胶质细胞几乎不表达。在脑缺血的研究中发现,小胶质细胞TLR4的表达显著上调,并诱发神经炎症反应,介导了脑缺血的炎症损伤[10,11]。我们发现,脑出血后TLR4表达明显高于对照组;随时间变化TLR4 mRNA表达相对倍数明显增高,于72 h达高峰;神经功能缺损评分也随时间逐渐增高,在48~72 h达高峰,相关检验结果显示二者呈直线正相关。提示脑出血后脑组织TLR4的表达与神经功能缺损明显相关,表明在TLR4可能在脑出血后脑炎症损伤中扮演重要角色。

目前针对脑出血的内科治疗仅限于控制血压、减轻脑水肿、降低颅内压、钙离子拮抗剂、预防并发症及再出血等被动的治疗方案,而脑内血肿主要靠机体缓慢吸收,不能及时有效的清除血肿及周围组织所产生的毒性细胞因子,治疗效果不理想。对于TLR4在脑出血炎症损伤中作用的进一步研究,将有助于揭示脑出血炎症损伤的上游机制,可能会为以后的治疗提供新的治疗方向和方法。本研究仅为初步研究,今后我们将利用TLR4敲除鼠进一步确证TLR4在脑出血中炎症反应中的作用及地位。

参考文献:

[1] Gao Z, Wang J, Thiex R, *et al*. Microglial activation and intracerebral hemorrhage[J]. Acta Neurochir Suppl, 2008, 105: 51-53.

[2] Wang J, Dore S. Inflammation after intracerebral hemorrhage[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2007, 27(5): 894-908.

[3] Figueiredo R T, Fernandez P L, Mourao-Sa D S, *et al*. Characterization of heme as activator of Toll-like receptor 4[J]. J Biol Chem, 2007, 282(28): 20221-20229.

[4] Tejima E, Zhao B Q, Tsuji K, *et al*. Astrocytic induction of matrix metalloproteinase-9 and edema in brain hemorrhage[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2007, 27(3): 460-468.

[5] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S. Revensible middle cerebral artery occlusion without cranie-ctomy in rats[J]. Storke, 1989, 20(1): 84-91.

[6] Zhao B Q, Wang S, Kim H Y, *et al*. Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke[J]. Nat Med, 2006, 12(4): 441-445.

[7] Lapchak P A, Araujo D M. Advances in hemorrhagic stroke therapy: conventional and novel approaches[J]. Expert Opin Emerg Drugs, 2007, 12(3): 389-406.

[8] Palsson-McDermott E M, O'Neill L A. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4[J]. Immunology, 2004, 113(2): 153-162.

[9] Cao C X, Yang Q W, Lv F L, *et al*. Reduced cerebral ischemia-reperfusion injury in Toll-like receptor 4 deficient mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 353(2): 509-514.

[10] Caso J R, Pradillo J M, Hurtado O, *et al*. Toll-like receptor 4 is involved in subacute stress-induced neuroinflammation and in the worsening of experimental stroke[J]. Stroke, 2008, 39(4): 1314-1320.

[11] Tang S C, Arumugam T V, Xu X, *et al*. Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(34): 13798-13803.

(编辑 栾 嘉)